

1. odber biologického materiálu a spôsob vyšetrenia v laboratóriu

Stolica

Čerstvú stolicu, najmenej veľkosti vlašského orecha, naberieme do vhodnej nádoby s dobre tesniacim uzáverom. Odosielame do laboratória čo najrýchlejšie. Pri dlhšej doprave, v teple, môže dôjsť ku kvasným procesom, ktoré poškodzujú vegetatívne štádiá alebo cysty prvokov. Nevyhovujúci je odber stolice rektálnou rúrkou (či tampón stolice) – málo materiálu! Pri susp. amebóze je nutné doručiť stolicu na vyšetrenie čo najrýchlejšie, maximálne do 30 minút po defekácii. To isté platí aj pre diagnostiku trofozoitov iných črevných prvokov. Pri negatívnom výsledku, ale príznakoch svedčiacich o črevnej parazitóze, je nutné opakovať odber a vyšetrenie ešte 2x vždy po 4 – 7 dňoch. Pri susp. amebóze a giardióze opakovať 5 až 10x po 2 dňoch.

Laboratórne vyšetrenie:

- a) **makroskopicky** – zistenie prítomnosti celých červov alebo ich častí, posúdenie konzistencie stolice, prítomnosti hlienov a krvi,
- b) **natívny mikroskopický preparát** – na dôkaz pohyblivých vegetatívnych štádií prvokov (trofozoitov),
- c) **koncentračné metódy** – flotačné a sedimentačné, pri ktorých sa cysty alebo vajíčka vyplavujú zo stolice na hladinu roztokov solí, alebo klesajú ku dnu, takže ich nachádzame v sedimente,
- d) **kultivačne** – na živnej pôde alebo zvierati, na rozmnoženie niektorých črevných prvokov,
- e) **farbiace metódy** – pre diagnostiku prvokov,
- f) **hrubý náter stolice** – na mikroskopický dôkaz vajíčok červov.

Diagnostika mrle detskej (*Enterobius vermicularis*) – perianálny odtlačok

- a) **Schüffnerova metóda** – sklenenou tyčinkou sa vytierajú perianálne riasy, materiál z tyčinky spláchneme do kvapky vody na podložnom sklíčku a necháme zaschnúť. Náter sa potom prejasní parafínovým olejom a prezerá pod mikroskopom. Hľadáme vajíčka mrlí.
- b) **Grahamova a Brumptova metóda** – na kožné riasy v okolí análneho otvoru sa pritlačí priesvitná lepiaca páska (izolepa) dlhá asi 4 cm. Samičky kladú vajíčka na kožné záhyby v okolí análneho otvoru, ktoré sa zachytávajú na lepiacu pásku po pritlačení na análny otvor. Po odtlačku prilepíme pásku na podložné sklíčko a prezeráme pod mikroskopom, hľadáme vajíčka mrlí (50 x 20 μm).

Moč

Odoberá sa ranný, hlavne posledná porcia, v množstve 50 – 100 ml. Pri podozrení na *Schistosoma haematobium* moč zhromažďujeme medzi 10 – 14 hodinou a odosielame v dobre uzavretej nádobke. Požiadavka: rýchle doručenie do laboratória! (Ak to nie je možné, materiál uložíme do chladničky, aby sa zabránilo liahnutiu miracídií). Pri podozrení na mikrosporídie odoberáme ranný moč.

Laboratórne vyšetrenie:

Zo sedimentu sa robí natívny aj farbený mikroskopický preparát (na dôkaz vajíčok *Schistosoma haematobium*, ojedinele trofozoity *Trichomonas vaginalis*).

Spútum

Dbáme o to, aby vykašľaný materiál pochádzal z dýchacích ciest, sliny sú pre diagnostiku bezcenné. Odoberáme do nádobky so širokým hrdlom, dobre uzavrieme.

Laboratórne vyšetrenie:

Zo sedimentu (po predchádzajúcej úprave spúta) sa pripravuje natívny mikroskopický preparát na dôkaz vajíčok (*Paragonimus* sp.), háčkov *Echinococcus granulosus*, larvy *Ascaris lumbricoides* a *Strongyloides stercoralis*), prvokov (*Cryptosporidium* sp., *Entamoeba gingivalis*, *Trichomax tenax*) a mikrosporídií. Spútum indukované po sprejovom ošetrení, pre dg pneumocystózy, upravíme antiformínom, preparát farbíme podľa Grocotta a Gömöriho a hľadáme cysty a trofozoity *Pneumocystis jiroveci*.

Vaginálny výter, urethrálny výter, prípadne prostatický exprimát

Vaginálny výter odoberáme vatovým tampónom zo zadnej poševnej klenby, urethrálny výter u mužov urobíme platinovou kľučkou zo steny uretry z hĺbky asi 2 cm. Urobíme v kvapke fyziologického roztoku natívny alebo farbený preparát (podľa Giemsa) k okamžitému mikroskopickému prehliadnutiu, alebo tampón vložíme do transportného média a pošleme do laboratória na kultivačné vyšetrenie (pohyblivé trofozoity *Trichomonas vaginalis*).

Duodenálna šťava

Pred odberom sa niekedy odporúča podať pacientovi 30 ml 40% MgSO₄. Obsah duodena o objeme 2 – 5 ml odoberáme do skúmavky a dobre uzavrieme. Požiadavka: urýchlene dodať do laboratória (do 2 hodín).

Poznámka: pri susp. giardióze odoberáme duodenálnu šťavu len pri trvajúcom podozrení po opakovanom negatívnom koprologickom náleze.

Laboratórne vyšetrenie:

Zo sedimentu sa pripravuje natívny aj farbený mikroskopický preparát (používa sa hlavne pre diagnostiku trofozoitov *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* sp.). V duodenálnej šťave môžeme nájsť aj vajíčka ankylostom, *Fasciola hepatica*, či larvy *Strongyloides stercoralis*.

Likvor

Odoberáme 1 – 2 ml likvoru asepticky do sterilnej skúmavky, uzavrieme netoxickou zátkou a ihneď doručíme do laboratória.

Laboratórne vyšetrenie:

Zo sedimentu sa pripravuje natívny i farbený mikroskopický preparát, kultivácia na živnej pôde alebo zvierati (*Toxoplasma gondii*, *Naegleria* sp., africké trypanosomy).

Bioptické materiály

Punktát z pečenevého abscesu

Pečeňové tkanivo sa odoberá punkciou v mieste, kde palpačne zistíme najcitlivejšie miesto. Materiál čo najrýchlejšie za aseptických podmienok v skúmavke doručíme do laboratória.

Poznámka: pri susp. pečenevej amebóze odporúčame pred plánovanou punkciou sérologické vyšetrenie pacienta, pri pozitívnom náleze nie je pre stanovenie diagnózy punkcia nutná.

Punktát z lymfatickej uzliny

Pri podozrení na trypanozomózu sa robí punkcia zdurenej lymfatickej uzliny hrubou ihlou. Odoberatý materiál sa spracováva nasledovne:

1. jeho prvú časť asepticky preniesieme do kultivačného média,
2. druhú časť tenko rozotrieme na niekoľko podložných sklíčok a necháme voľne zaschnúť.

Nátery aj pôdu doručíme do laboratória. Nález trypanozóm v uzline môže byť pozitívny, aj keď v perifernej krvi už nie sú prítomné.

Punktát zo sterna alebo zo sleziny

Pri podozrení na viscerálnu leishmaniózu spracujeme materiál, ktorý bol asepticky odoberatý bežným spôsobom, rovnako ako punktát z lymfatických uzlín v bodoch 1 a 2.

Materiál z kožných vredov

Pri podozrení na kožnú leishmaniózu odoberáme materiál z okraja vredov (smerom do zdravého tkaniva) hrubšou ihlou. Napichnutím tkaniva a otáčaním ihly odoberieme kúsočky tkaniva. Materiál rozotrieme na podložné sklíčko, necháme zaschnúť a časť vložíme do kultivačnej pôdy. Doručíme do laboratória.

Laboratórne vyšetrenie:

Zo všetkých hore uvedených bioptických materiálov sa robí farbený mikroskopický preparát, izolačný pokus na živnej pôde a niekedy na zvierati – myši subkutánnym naočkovaním materiálu do koreňa chvosta alebo za ušné boltce.

Excízia kože

Pri susp. filarióze (onchocerkóze) zrežeme skalpelom povrchovú vrstvu kože až do objavenia kapilárneho krvácania. Materiál vložíme do skúmavky s fyziologickým roztokom a ihneď odošleme do laboratória. Presakujúci tkanivový výpotok roztrieme na podložené sklíčko a po zaschnutí zašleme do laboratória.

Laboratórne vyšetrenie:

Z kožného rezu pri teplote + 37°C sa prípadne prítomné larvy filárií počas niekoľko hodín uvoľňujú do fyziologického roztoku – mikroskopická kontrola. Z tkanivového výpotku sa vyhotoví farbený mikroskopický preparát.

Zoškrab z povrchu pokožky pri svrabe

Svetloružové pupienky na predilekčných miestach rozleptáme potretím 10% NaOH (KOH) a asi o 1 minútu zoškrabujeme povrchovú vrstvu pokožky skalpelom až do začiatku presakovania kapilárnej krvi. Získaný materiál preniesieme na podložné sklíčko, prikryjeme krycím a ihneď pošleme do laboratória. Miesto po zoškrabe ošetríme a súčasne neutralizujeme 3% ung. boricum.

Laboratórne vyšetrenie:

Mikroskopicky hľadáme zvyšky roztočov *Sarcoptes scabiei* a vajíčka kladené samičkou do podkožných chodbičiek.

Zoškrab z črevnej sliznice

Pri opakovanej neprítomnosti vajíčok črevných schistozóm v stolici a pretrvávajúcom klinickom obraze, odoberieme vzorku tkaniva rektálnou

biopsiou. Materiál vložíme do skúmavky s malým množstvom fyziologického roztoku.

Laboratórne vyšetrenie:

V preparáte z tkaniva (na podložnom skle jemne roztláčené krycím sklom) a v natívnom preparáte zo sedimentu hľadáme mikroskopicky vajíčka *Schistosoma* sp.

Rôzne extirpované tkanivá

Extirpované lymfatické uzliny

Zväčšenú lymfatickú uzlinu alebo jej časť vložíme do skúmavky s fyziologickým roztokom (asepticky) a odošleme do laboratória.

Laboratórne vyšetrenie:

Uzlina sa rozdrví na redšiu suspenziu a injikuje sa zvieraťu v pokuse o izoláciu kmeňa *Toxoplasma gondii*.

Poznámka: nie je potrebné, ak máme pozitívny sérologický nález.

Excízia zo svalu

Pri podozrení na trichinelózu odoberáme malú vzorku, najčastejšie z m. deltoideus a m. gastrocnemius (transverzálny odber) a materiál vložíme do vhodnej nádoby s fyziologickým roztokom.

Laboratórne vyšetrenie:

Kompresnou larvoskopickou metódou vyšetrenia svalstva hľadáme larvy *Trichinella spiralis*.

Poznámka: svalová excízia nie je potrebná, ak máme pozitívny sérologický nález.

Pečeňové tkanivo a pitevné tkanivá

Materiál z punkcie alebo pooperačnej biopsie sa väčšinou vyšetruje histologicky (fixovaný). Nefixovanú časť môžeme poslať vo fyziologickom roztoku na parazitologické vyšetrenie, na farbené preparáty alebo na kultivačné vyšetrenie, či na zvierati v pokuse o izoláciu parazita.

Parazitické červy

alebo ich časti (články pásomnice, makroskopické larvy a pod.) posielame urýchlene na vyšetrenie vo vode alebo fyziologickom roztoku, **nikdy nie nasucho alebo fixované!**

Článkonožce

s chitínovým telom dávame do vhodných nádobiek s pilinami navlhčenými amylacetátom, dobre uzavreté. Kliešťov môžeme uložiť do skúmavky s glycerolom alebo so stebлом trávy.

Krv

Krv na parazitologické vyšetrenie odoberáme:

- a) na sérologickú diagnostiku,
- b) na zhotovenie mikroskopických preparátov,
- c) na izolačný pokus na živnej pôde či zvierati.

Ad a) Krv na sérologickú diagnostiku

Venóznou krv v množstve 4 – 5 ml bez konzervačných prísad odoberieme do sterilnej skúmavky, uzavrieme netoxickou zátkou a ihneď odošleme.

Laboratórne vyšetrenie:

Pre sérologické vyšetrenie sa rozhodneme všade tam, kde iný dôkaz infekčného agens nie je možný, alebo je dosť obtiažny (tkanivové parazitózy).

Ad b) Krvné mikroskopické preparáty

1. natívny preparát (pri podozrení na africkú trypanosomózu v začiatku ochorenia a dôkaz krvných mikrofilárií): kvapku krvi zriedime s fyziologickým roztokom na podložnom sklíčku, prikryjeme krycím a hľadáme pod mikroskopom pohyblivé trypanozómy alebo mikrofilárie (pri susp. wuchererióze odber medzi 22. – 24. hodinou = nočná periodicita vyplavovania mikrofilárií; pri susp. loaóze odber medzi 10. – 13. hodinou = denná periodicita).
2. Pre špeciálne farbenie zhotovujeme krvný rozter a tzv. hrubú kvapku. Používame vždy nové podložné sklíčka, dobre odmastené.
 - Kvapku kapilárnej krvi, získanú po napichnutí bruška prstu, nanesieme na podložné sklíčko a priloženou hranou kratšej strany druhého sklíčka krv pevným ťahom rovnomerne rozotrieme.
 - Hrubá kvapka sa zhotovuje roztrútením krvi na podložné sklíčko podobne, ako je vyššie uvedené, s tým rozdielom, že krv roztrútime na plochu len cca 1,5 cm špirálovým pohybom, v ktorom pokračujeme 15 – 20 sekúnd, aby sme krv čiastočne defibrinovali. Preparáty po voľnom zaschnutí každý zabalíme zvlášť (NEFIXUJEME!) a odošleme do laboratória. (Pri susp. malárii odoberáme krv v čase horúčkovitých záchvatov). Niekedy sa odporúča vyšetrenie väčšieho množstva krvi ako obsahuje krvný rozter. V takomto prípade odoberáme venóznou krv (4 ml)

do skúmavky s antikoagulantom a dodáme do laboratória do 1 hodiny po odbere. Mikroskopicky sa vyšetruje sediment vo farbenom preparáte (na dôkaz malárie, filarióz a trypanozóm).

Ad c) Odber krvi pre izolačný pokus na živnej pôde alebo zvierati

Venóznou krv v množstve 5 ml odoberáme injekčnou striekačkou, do ktorej predtým nasajeme antikoagulačnú látku (heparin, citrát atď.). Posielame v skúmavkách za aseptických podmienok.

Laboratórne vyšetrenie:

Uskutočníme pokus o izoláciu pôvodcu parazitózy na živnej pôde (trypanozómy, viscerálnej leishmaniózy) alebo na zvierati (toxoplazmóza).

Odber vzorky pre vyšetrenie metódou PCR

Krv do EDTA (menej vhodné do citrátu, **nehodné do heparínu!**), plazma, likvor, plodová voda, iné telové tekutiny, BAL, tkanivá (≥ 25 mg), ster špeciálnym sterilným tampónom (napr. z cervixu alebo uretry, exudáty z pustúl a vezikúl a pod). Odber sa musí vykonať asepticky do sterilnej skúmavky.

Imunodiagnostika

Imunodiagnostické metódy sú metódami

- nepriameho dôkazu niektorých parazitárnych infekcií na základe dôkazu protilátok v sére alebo
- priameho dôkazu vyvolávateľa jeho vychytaním špecifickými protilátkami v biologickom materiáli (krv, obsah abscesu, moč, liquor atď.).

Väčšina sérologických testov je založená na detekcii špecifických protilátok rôznych izotypov (IgG, IgA, IgM) a funkcií (neutralizačné, komplement fixačné), ktoré sú produkované hostiteľom v rôznom období a množstve v rámci imunitnej odpovede na infekciu. Dostupné používané metódy sú aglutinácia, KFR, RID, imunofluorescencia, ELISA, Western blot. Detekcia špecifických protilátok má rôznu výpovednú hodnotu. Vo všeobecnosti je možné zhrnúť, že pri klasických metódach (aglutinácia, KFR) sa detekuje zmes protilátok a pre diagnostiku je potrebné sledovať dynamiku ich tvorby minimálne z 2 odberov v rozsahu 14-21 dní. Pri diagnostike špecifických protilátok rôznych izotypov stačí obvykle jedna vzorka. IgM protilátky sa tvoria v akútnom období infekcie a pretrvávajú 3-6 mesiacov po primoinfekcii. U novorodenca sú znakom intrauterinnej infekcie. IgG protilátky sa začínajú tvoriť neskôr a pretrvávajú dlhodobo –

až celoživotne. Sú znakom imunity. IgA protilátky sú takisto skoré, ale na rozdiel od IgM sa opakovane ich koncentrácia zvyšuje pri reaktivácii ochorenia. Bežne sa sérologické metódy používajú pri diagnostike protozoárnych infekcií (extraintestinálna amebióza, trypanozomióza, leishmanióza, malária, toxoplazmóza) a helmintóz (clonorchióza, cysticeróza, hydatidóza, filarióza, schistozomióza, trichinelóza, toxokaróza). Interpretácia laboratórnych nálezov vyžaduje skúsenosti a dobré teoretické znalosti. Perzistencia protilátok mnoho rokov po akútnej infekcii a často chronický priebeh infekcie s možnou reaktiváciou umožní len zriedkavo odlíšiť akútnu a chronickú infekciu.

Na rozdiel od dôkazu protilátok je detekcia cirkulujúcich antigénov parazita v sére, moči, stolici vhodnejším markerom aktívnej infekcie. Dôkaz antigénu v obsahu abscesu alebo v cyste môže stanoviť diagnózu napr. pri amébovej cyste alebo cyste hydatidóze. Výhodou týchto metód používaných dnes na detekciu rôznych antigénov (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas vaginalis*, *Pneumocystis*) je senzitivita. Nevýhodou je detekcia jediného mikroorganizmu, zatiaľ čo klasické mikroskopické vyšetrenie dáva príležitosť skúsenému parazitológovi rozpoznať prípadne viac parazitov.

Molekulárna diagnostika

Táto laboratórna technika je založená na skutočnosti, že každý organizmus obsahuje špecifickú sekvenciu nukleových kyselín, ktorá môže byť hybridizáciou znmnožená a použitá na detekciu. Táto sekvencia je natoľko špecifická pre organizmy (podobne ako odtlačky prstov – fingerprinting), že ju je možné použiť pre epidemiologické identifikácie a sledovanie rozšírenia parazitov v oblasti alebo vektore. Prepracovanie molekulárnych metód umožnilo použitie rôznych nastavení reakcií (dot blot, Southern blot, PCR, in situ hybridizácia) pre priamy dôkaz a identifikáciu *Plasmodium sp.*, *Leshmania sp.*, *Trypanosoma sp.*, *Entamoeba histolytica*, *Schistosoma sp.*, *Onchocercus sp.*, *Taenia sp.*, *Trichomonas vaginalis*.

Schéma č. 1: Morfológia vajíčok lekársky významných červov
Metagonimus yokogawai Heterophyes heterophyes Opisthorchis felienis
Clonorchis sinensis Taenia saginata Hymenolepis nana Enterobius
vermicularis Trichuris trichiura Ascaris lumbricoides Ancylostoma
duodenale Diphylobotrium latum Hymenolepis duodenale Fasciolopsis
buskii Fasciola hepatica Schistosom mansoni Schistosoma haematobium
Schistosoma japonicum Ascaris lumbricoides Trichostron gyius
Paragonimus westermani

2. metódy laboratórnej diagnostiky helmintóz a protozoárnych nákaz

Vajíčka červov zisťujeme mikroskopicky v tzv. hrubom nátere zo stolice. Na jeho zhotovenie sa najčastejšie používa metóda podľa Heina alebo podľa Katoa.

Poznámka: Tieto metódy sú málo záchytné a na dôkaz cýst prvokov (Protozoa) nevhodné.

Náter podľa Heina

Na čisté podložné sklíčko sa kvapne destilovaná voda, v kvapke sa rozmieša menšie množstvo stolice v pomere 1 diel vody na 3 diely stolice. Zmes sa rozotrie na ploche asi 4 x 2 cm. Náter sa nechá voľne zaschnúť. Pred vyšetrením sa prejasní kvapkou parafínového oleja a prezerá pod mikroskopom pri 60 – 100 násobnom zväčšení.

Náter podľa Katoa

Náter podľa Katoa je koprologická diagnostická metóda slúžiaca na záchyt vajíčok parazitov. Jej podstatou je hrubý náter stolice, pri čom sa náter stolice prekrýva celofánovým prúžkom impregnovaným Kato farbiacim roztokom (malachitová zeleň, glycerol, fenol), ktorý slúži na uľahčenie mikroskopického pozorovania vajíčok parazitov.

A. Príprava roztokov

Farbiaci roztok:

- 500 ml 6% fenolu, kryštalický koncentrovaný fenol roztopiť vo vodnom kúpeli, 30 ml tekutého fenolu doplniť destilovanou vodou do 500 ml,

- 500 ml glycerínu ,
- 6ml 3% roztok malachitovej zelene (0,3 g malachitovej zelene rozpustiť v 10 ml destilovanej vody).

Nastrihané celofánové prúžky (rozmer cca 4x2 cm) namáčať minimálne 24 hodín vo farbiacom roztoku. Roztok je stabilný 1 rok.

B. Popis jednotlivých krokov postupu metódy

1. na podložné sklíčko rovnomerne naniesť špajľou cca 0,5 g vyšetrovanej vzorky stolice
2. náter stolice prekryť prúžkom celofánu namočeným vo farbiacom roztoku
3. gumenou zátokou rovnomerne roztláčiť náter stolice pod celofánom
4. mikroskopické hodnotenie celého preparátu pri zväčšení 100, až 200x, verifikácia podozrivých útvarov pri zväčšení 400x
5. preparát po vyšetrení odložiť do nádoby s dezinfekčným roztokom

Hodnotenie:

Podľa charakteristického tvaru, veľkosti a farby možno rozpoznať jednotlivé druhy vajíčok helmintov.

Na dôkaz vajíčok helmintov a cýst Protozoa v stolici sú vhodnejšie, pre vyššiu záchytnosť, **tzv. koncentračné metódy**:

- a) **flotačná** (podľa Fausta), pri ktorej sa cysty a vajíčka v koncentrovanom roztoku solí vyplavujú na hladinu,
- b) **sedimentačná** (formolová – MIFC) metóda, pri ktorej naopak vajíčka a cysty klesajú ku dnu, takže ich nachádzame v sedimente.

Flotácia v sírane zinočnatom (Faust et al. 1939 – upravené)

Vzorku natívnej stolice o hmotnosti asi 1 g preniesť do krvnej skúmavky a pomocou drevenej tyčinky dôkladne rozmiešať vo fyziologickom roztoku alebo destilovanej vode. Suspenziu centrifugovať 1 minútu pri 2500 ot./min., supernatant opatrne zliať a premytý sediment rozsuspendovať v roztoku síranu zinočnatého o hustote 1,180 (331 g ZnSO₄ x7 H₂O doplniť destilovanou vodou do objemu 1000 ml). Skúmavku doplniť asi 1 cm pod okraj a zcentrifugovať 1 minútu pri 2500 ot./min. Povrchovú blanku zo skúmavky ihneď preniesť bakteriologickou kľúčkou na podložné sklo a prikryť krycím sklíčkom. Povrchovú blanku možno zo skúmavky zobrať priamo na krycie sklíčko tak, že sa skúmavka doplní roztokom až po okraj a krycie sklíčko sa ponechá 20 minút na hladine flotačného roztoku. Mikroskopovať so zväčšením 100 x celú plochu krycieho sklíčka a so zväčšením 400 x asi 20 zorných polí.

Hodnotenie:

Nachádzame vajíčka *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* – neoplodené, *Ancylostoma*, *Hymenolepis*, larvy *Strongyloides* a cysty Protozoa, ktoré sú charakteristicky zdeformované.

Formolová metóda – MIFC

A. Príprava roztokov

1. Roztok merthiolátu:

Merthiolát 1, 0 g
Destilovaná voda ad
1000, 0 ml

2. Zásobný roztok MIF:

destilovaná voda250 ml
1 ‰ vodný roztok merthiolátu
200 ml
36-38% formaldehyd25 ml
glycerín p.a 5 ml

Dôkladne rozmiešať a uchovávať v hnedej fľaške so zabrúsenou zátkou.

3. Lugolov roztok

destilovaná voda
100 ml
jodid draselný 10 g
kryštalický jód 5 g

Roztok má byť čerstvý, nie **starší ako týždeň**. Roztok treba uchovávať v hnedej tmavej fľaši so zabrúsenou zátkou v tme.

B. Popis jednotlivých krokov postupu metódy

1. Pre každú vzorku stolice si pripravíme do stojana 2 skúmavky (Wassermanovu a centrifugačnú).
2. Do centrifugačnej skúmavky dáme lievik so štvorčekom dvojmo skladanej gázy.

3. Do Wassermanovej skúmavky napipetovať 5 ml zásobného roztoku MIF a 1 ml Lugolovho roztoku.
4. Špajľou pridáme stolicu vo veľkosti hrášku a pomocou dvoch špajlí dokonale stolicu homogenizujeme.
5. Suspenziu precedíme cez gázu do centrifugačnej skúmavky a pridáme 7 ml éteru (približne 1 cm pod povrch skúmavky). Skúmavku dôkladne zazátkujeme a silno rukou trepeme 1 - 2 minúty, pokiaľ suspenzia nie je úplne homogénna. Ak nie je suspenzia úplne homogénna (nad vrstvou stolice je éter), pridáme asi 1 ml destilovanej vody, zazátkujeme a znovu trepeme.
6. Zátku odstránime, skúmavku postavíme do stojana na 3 minúty, aby sa suspenzia ustálila.
7. Potom centrifugujeme 3 min pri 2500 otáčok/min. V skúmavke sú vytvorené po centrifugácii 4 vrstvy: éter, detritus zo stolice, roztok MIF a sediment.
8. Drevenou špajľou oddelíme „zátku“ detritu od steny skúmavky a rýchlym pohybom zlejeme celý supernatant. Vatovým tampónom utrieme vnútornú stenu skúmavky od detritu.
9. Pasteurovou pipetou dôkladne zhomogenizujeme sediment, časť z neho odoberieme, zhotovíme preparát na podložnom sklíčku a prikryjeme krycím sklíčkom.
10. Mikroskopické hodnotenie celého preparátu pri zväčšení 100 až 200x, pri verifikácii podozrivých útvarov 400 x.
11. Preparát po vyšetrení odložiť do nádoby s dezinfekčným roztokom.

Hodnotenie:

Pri náleze vajíčok, cýst a trofozoitov parazita treba určiť jeho rod a druh. V prípade neprítomnosti týchto útvarov je výsledok hodnotený ako negatívny. Táto metóda nie je celkom spoľahlivá na zachytenie oplodnených vajíčok *Ascaris lumbricoides*.

V niektorých prípadoch laboratórnej diagnostiky sa mikroskopický dôkaz parazita opiera o morfológické rozlíšenie vnútornej štruktúry bunky. Používa sa preto zafarbený mikroskopický preparát.

Farbenie podľa Giemsu

Metóda farbenia podľa Giemsu je diagnostická farbiaca metóda, ktorá sa používa hlavne v parazitológii na mikroskopický dôkaz parazitov vo vhodnom klinickom materiáli. Citlivosť cytologických farbiacich techník je priamo úmerná odberu materiálu určeného k diagnostike. Farbí sa

farbiacim roztokom Giemsa a na základe farbitelnosti jednotlivých štádií parazitov alebo vnútorných štruktúr. Na základe veľkosti mikroorganizmu, či vývojového štádia parazita môžeme priamo identifikovať pôvodcu. Túto metódu používame v laboratóriu pre dôkaz *Pneumocystis jiroveci* vo vhodnom biologickom materiáli, *Trichomonas vaginalis*, *Acanthamoeba* sp. *Naegleria fowleri*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica/dispar*. Používa sa ďalej pri dôkaze tkanivových cýst *Toxoplasma gondii* v bioptických preparátoch.

A. Príprava roztokov

Pufrovaná destilovaná voda - príprava:

Hydrogénfosforečnan draselný 0, 25 g
Dihydrofosforečnan sodný 1, 7 g
Destilovaná voda 1000 ml

Farbiaci roztok Giemsa – príprava:

Zmiešať 10 ml komerčne vyrábaného farbiva Giemsa so 190 ml pufrovanej destilovanej vody. Premiešať a nechať stáť 10 min.

Farbiaci roztok je treba pripravovať vždy čerstvý !

B. Popis jednotlivých krokov postupu metódy

1. fixácia pripravenej vzorky na podložnom sklíčku:

Priamy preparát z biologického materiálu – číselne označené podložné sklíčko s náterom biologického materiálu prevrstviť na 3 - 5 minút 96% metanolom. Zvyšok metanolu zlejeme a necháme zaschnúť.

2. farbenie fixovaného preparátu:

Farbiaci roztok Giemsa - 20 – 30 min. (najlepšie vo farbiacej kyvete v zvislej polohe podľa šarže farbiva, nutné vyskúšať).

3. opláchnutie tečúcou vodou (pri zmývaní farbiva z podložného sklíčka je nutné venovať pozornosť dôkladnému spláchnutiu farbiaceho roztoku (je vhodné použiť stričku) tak, aby sa nedostali vrchné vrstvy farbiva do kontaktu s náterom, lebo by bol náter kontaminovaný nečistotami.

4. mikroskopické hodnotenie preparátu (pri zväčšení 200–400x), vyhodnotiť min. 10 zorných polí.

Farbenie podľa Ziehl – Neelsena

Ziehl-Neelsenovo farbenie je metóda diagnostického farbenia, ktorá sa používa na farbenie acidorezistentných mikroorganizmov. Ziehl-Neelsenovým farbením je možné hodnotiť nielen acidorezistentné baktérie ako sú mykobaktérie, aktinomycéty, ale aj bakteriálne spóry, askospóry niektorých kvasiniek i vývojové štádiá niektorých prvokov - kokcií.

A. Príprava roztokov

1. roztok koncentrovaného karbolfuchsínu – príprava:

Zložka A.

- 20 ml 95% ethylalkoholu
- 4g bázičného fuchsínu

Zložka B.

- 100 ml destilovanej vody
- 8 g fenol
- po úplnom rozpustení prefiltrovať
- po prefiltrovaní sa obe zložky zmiešajú

Uskladnenie pri izbovej teplote. Roztok je stabilný 1 rok.

2. 1 % kyselina sírová – príprava:

H₂SO₄ 96 % 1 ml

Destilovaná voda99 ml

Pri uskladnení pri izbovej teplote je roztok stabilný 1 rok.

3. 5 % malachitová zelená – príprava:

Malachite green oxalate 5 g

Destilovaná voda100 ml

Uskladnenie pri izbovej teplote. Roztok je stabilný 1 rok.

B. Popis jednotlivých krokov postupu metódy:

1. fixácia pripravenej vzorky na podložnom sklíčku:

§ priamy preparát z biologického materiálu – číselne označené podložné sklíčko s náterom biologického materiálu prevrstviť na 2 - 5 minút 96% metanolom

§ vysušenie pri izbovej teplote

§ zľahka ofixovať plameňom

2. farbenie fixovaného preparátu:

§ koncentrovaný karbolfuchsín 20 – 30 min., bez zahrievania

§ opláchnutie tečúcou vodou

§ diferenciácia v 10% H₂SO₄ 20 – 60 s (pokiaľ steká červené farbivo)

§ opláchnutie tečúcou vodou

§ malachitová zeleň 5 min.

§ opláchnutie tečúcou vodou

§ vysušenie pri izbovej teplote

§ montovanie do montovacieho média (kanadský balzam)

3. mikroskopické hodnotenie preparátu (pri zväčšení 200, 400x a pri použití imerzie 1000x), vyhodnotiť min. 10 zorných polí.

Použitá literatura

HÜBNER, J. a kol:

Parazitární nákazy a onemocnění člověka a jejich laboratorní diagnostika.
Praha, IPVZ, 1995, 66 s.

ČATÁR, G., BÖHMER, D.:

Lekárska parazitológia.
Praha, BON – BON spol. s r.o., 1998.

SAWITZ, W.G.:

Medical Parasitology.
New York – Toronto, Blackiston Comp., 1950, 296 s.

VALENT, M., KLOBUŠICKÝ, M.:

Urogenitálna trichomoniáza.
Martin, OSVETA, 1988, 250 s.

STRAKA, Š. a kol.:

Príručka ovoskopickej diagnostiky črevných helmintov.
Martin, Jeséniova LFUK, 1996, 35 s.

JÍROVEC, O. a kol.:

Parasitologie pro lékaře. III. prepracované vydanie.
Praha, AVICENUM, 1977, 798 s.

TOLAROVÁ, V. a kol.:

Doporučené metody laboratorní diagnostiky tropických parazitóz.
Príloha č. 12/1989 k Acta hyg., epid. et microbiologica.
Praha, IHE, červen 1989, s. 13

GARCIA, L.S., BRUCKNER, D.A.:

Diagnostic medical parasitology.
Washington, D.C., ASM PRESS, 1997, 937 s.